

定量 ^1H NMR による高純度標準物質の
新規なキャラクタリゼーション手法に関する研究

Studies on novel characterization methods of
high-purity reference materials by quantitative ^1H NMR

金沢大学大学院自然科学研究科
物質化学専攻
斎藤直樹

Abstract

In this dissertation, novel characterization methods of high-purity reference materials of water-soluble organic compounds by quantitative (q)- ^1H NMR were systematically studied. First, the conventional signal separation method in q- ^1H NMR by pH (pD) adjustment of sample solutions was precisely improved to determine the accurate purity of amino acids. When 22 kinds of high-purity reference materials of non-protein amino acids were characterized by the present method, their purities were able to be determined at 0.59 % to 1.88 % relative expanded uncertainty ($k=2$) with SI traceability.

Secondly, another conventional signal separation method was developed by adjusting the solvent composition with deuterium oxide to separate the analyte signals from the large waster signal. The method was applied to the determination of acylcarnitines which are rapidly hydrolyzed in both acidic and basic aqueous solutions. Five kinds of high-purity reference materials of the acylcarnitines were characterized by the method developed. Their purities were able to be determined at 0.20 % to 0.92 % relative expanded uncertainty ($k=2$) with SI traceability.

Thirdly, a novel q- ^1H NMR method combined with off-line chromatography was devised as *Extended Internal standard method* of q- ^1H NMR assisted by *Chromatography* (EIC). In the EIC, the ^1H signal areas of the analyte can be quantified accurately even when the chemical shifts of the analyte are completely overlapped by those of the impurity. A high-purity reference material of 4-chlorophenol was well characterized by the EIC, although the ^1H signals of 4-chlorophenol were not able to be separated from those of phenol as an impurity by using the conventional methods mentioned above. The purity of the high-purity reference material of 4-chlorophenol was able to be determined at 0.22 % as the relative expanded uncertainty ($k=2$) with SI traceability. The novel methods developed in this study will greatly contribute to future developments of the high-purity reference materials in Japan.

博士論文要旨

第 1 章 序論

近年、定量 ^1H NMR は有機化合物の革新的な定量分析法として注目を集めており、JIS にも収載されている。しかし、定量 ^1H NMR のスペクトルでは、0 ppm~15 ppm の狭い範囲に一般の有機化合物のシグナルが検出されるため、類似不純物とのシグナルの重なりが深刻な課題となっている。これに加えて、親水性有機化合物を対象とする場合には、その交換性 ^1H 核に起因する水由来の強大なシグナルをも回避しなければならない。これらの課題がボトルネックとなって、アミノ酸をはじめとする親水性有機化合物の高純度標準物質のキャラクタリゼーションは、ほとんど進んでいない。

本研究では、定量 ^1H NMR によるキャラクタリゼーションの適用範囲を親水性有機化合物の高純度標準物質に拡大するために、以下の通り新規なキャラクタリゼーション手法の系統的な研究に取り組んだ。

- ・ 溶解液の pH (pD) 変化に基づくシグナル分離法の高度化とキャラクタリゼーション
- ・ 溶解液の組成変化に基づくシグナル分離法の高度化とキャラクタリゼーション
- ・ クロマトグラフィーを併用した新規な定量 ^1H NMR の開発とキャラクタリゼーション

目標とする水準は、相対拡張不確かさ ($k=2$) で 1 %と設定し、国際単位系 (SI) にトレーサブルで信頼性の高いキャラクタリゼーションを目指した。本研究は、社会から求められる実用標準物質の整備を担うものである。

第 2 章 溶解液の pD 変化に基づくシグナル分離法の高度化と非タ

ンパク質性アミノ酸高純度標準物質のキャラクタリゼーション

代表的な親水性有機化合物であるアミノ酸類を対象とした。本章では、共存する不純物の影響を除去するために、溶解液の pD を調節したシグナル分離法を検討した。図 1 に、DSS- d_6 を加えた *O*-ホスホエタノールアミンの 0.1 mol/L および 1 mol/L 重水酸化ナトリウム溶液の ^1H NMR スペクトルを示す。溶解液に 0.1 mol/L 重水酸化ナトリウム溶液を用いた場合、C1 位の ^1H 核のシグナル (約 3.85 ppm) に類似不純物 X のシグナル (約 3.90 ppm) が重なった。しかし、溶解液に 1 mol/L 重水酸化ナトリウム溶液を用いた場合、C1 位の ^1H 核のシグナル (約 3.74 ppm) から類似不純物 X のシグナル (約 3.87 ppm) が分離できた。1 mol/L 重水酸化ナトリウム溶液では、0.1 mol/L 重水酸化ナトリウム溶液に比べて、*O*-ホスホエタノールアミンのシグナルでは約 0.11 ppm、類似不純物 X のシグナルでは約 0.03 ppm 高磁場シフトした。これは、試料溶液の pD が高いと、*O*-ホスホエタノールアミンお

よび類似不純物 X が持つ官能基の違いにより ^1H 核の磁氣的遮蔽の強まりに有意な差が生じた結果と考えられる。1 mol/L 重水酸化ナトリウム溶液において、C1 位の ^1H 核のシグナルの積分区間から純度を求めた。なお、当該積分区間に認められた不純物のシグナル面積は減算した。その結果、*O*-ホスホエタノールアミンの純度を 0.9425 kg/kg \pm 0.0146 kg/kg (±の後の数字は、包含係数 $k=2$ の拡張不確かさ) と

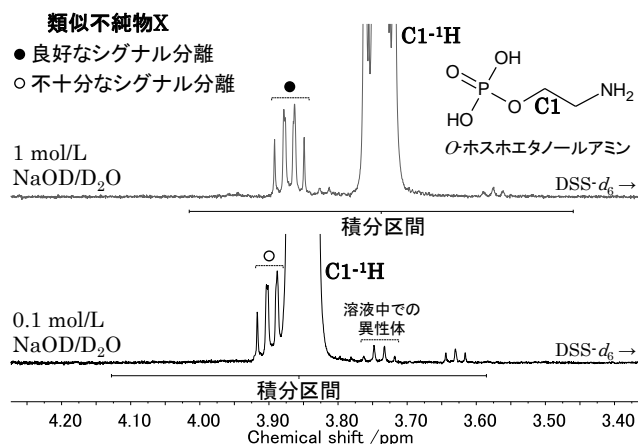


図1 異なる溶解液を用いた ^1H NMR スペクトル DSS- d_6 のシグナルを 0 ppm とした。

SI トレーサブルに決定できた。なお、重水のほか、0.1 mol/L および 1 mol/L 重塩酸溶液を溶解液に用いた場合、類似不純物 X のシグナルは *O*-ホスホエタノールアミンのシグナルから分離できなかった。*O*-ホスホエタノールアミンで得られた知見を基に他のアミノ酸類を検討したところ、0.1 mol/L あるいは 1 mol/L の重水酸化ナトリウム溶液を溶解液とすることで、水由来のシグナルのみならず類似不純物であるアミノ酸類のシグナルをも分離させることに成功した。この方法を中核とした結果、22 種類の非タンパク質性アミノ酸類の高純度標準物質に対して、0.59 %～1.88 %の相対拡張不確かさ ($k=2$) で SI トレーサブルなキャラクタリゼーションを実現できた。

第3章 溶解液の組成変化に基づくシグナル分離法の高度化とアシルカルニチン高純度標準物質のキャラクタリゼーション

親水性有機化合物のカルボン酸エステルであるアシルカルニチンを対象とした。アシルカルニチンは、酸性および塩基性溶液中で速やかに加水分解するため、溶解液の pH 調節によるシグナル分離法を適用できない化合物である。本章では、アシルカルニチンの不斉炭素である C3 位に結合する ^1H 核のシグナル (ターゲットシグナル) が、類似不純物であるカルボン酸やカルニチンのシグナルから分離できることを見出した。*O*-パルミトイル-DL-カルニチンのメタノール- d_4 溶液では、類似不純物であるパルミチン酸のシグナルは約 0.9 ppm～約 2.3 ppm の範囲で、類似不純物であるカルニチンのシグナルは約 2.6 ppm～約 4.6 ppm の範囲で検出されることがわかった。これに対して、*O*-パルミトイル-DL-カルニチンのターゲットシグナルは約 5.7 ppm で検出され、これら類似不純物のシグナルと全く異なる化学シフトを示した。これは、*O*-パルミトイル-DL-カルニチンの C3 位にはエステル結合が存在するため、C3 位の ^1H 核の磁氣的遮蔽が著しく弱まるためと考えられる。しかし、

ターゲットシグナルは水由来のブロードなシグナルに隣接し、そのシグナルの裾に重なることがわかった。そこで、水由来のシグナル分離を実現できるよう、溶解液の組成を調節したシグナル分離法を検討した。図 2 に、*O*-パルミトイル-DL-カルニチン溶液における水由来のシグナル幅を示す。溶解液には、異なる割合で重水を混合させたメタノール-*d*₄ 溶液を用いた。

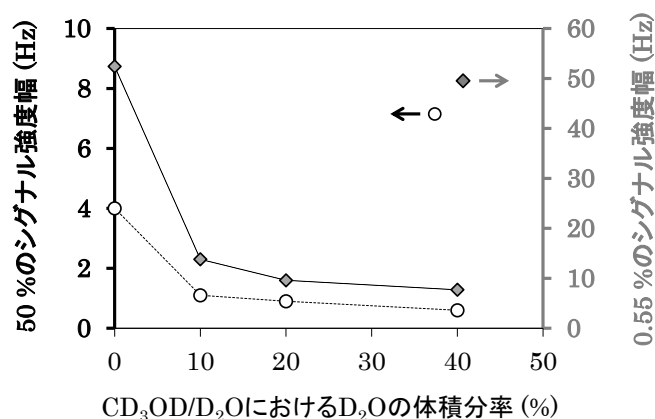


図 2 交換性 ¹H 核に起因する水由来のシグナル幅

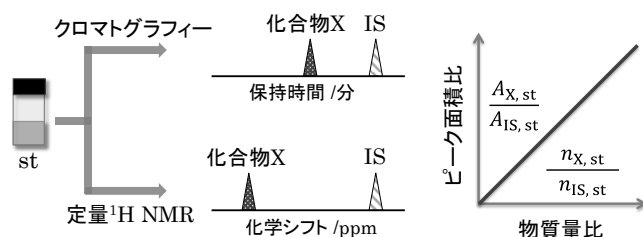
メタノール-*d*₄ 溶液中の重水の割合が増加するにつれて、水由来のシグナルがシャープになることを見出した。重水を 20 %加えたメタノール-*d*₄ 溶液では、水由来のピークトップの 50 %におけるシグナル幅は約 1/4、0.55 %におけるシグナル幅は約 1/5 となった。このとき、ターゲットシグナルに対する水由来のシグナルの重なりは解消された。なお、重水を 40 %加えたメタノール-*d*₄ 溶液では、*O*-パルミトイル-DL-カルニチンが持つ界面活性剤としての機能により、比較的多量の発泡を短時間で抑えることが困難であった。また、重水を溶媒に用いた場合は、*O*-パルミトイル-DL-カルニチンの試料は溶解しなかった。そこで、重水を 20 %加えたメタノール-*d*₄ 溶液において、ターゲットシグナルから純度を求めた結果、*O*-パルミトイル-DL-カルニチンの純度を 0.8789 kg/kg ± 0.0092 kg/kg (±の後の数字は、包含係数 *k*=2 の拡張不確かさ) と SI トレーサブルに決定できた。この方法を中核とした結果、5 種類のアシルカルニチンの高純度標準物質に対して、0.20 %~0.92 %の相対拡張不確かさ (*k*=2) で SI トレーサブルなキャラクタリゼーションを実現できた。

第 4 章 クロマトグラフィー支援拡張内標準法の開発とクロロフェ

ノール高純度標準物質のキャラクタリゼーション

親水性有機化合物であるクロロフェノールを対象とした。クロロフェノールのシグナルは、水由来のシグナルと化学シフトが大きく異なるため、互いにシグナル分離された。しかしながら、4-クロロフェノールでは、溶解液の pD あるいは組成の調節によるシグナル分離法では、類似不純物であるフェノールのシグナル分離が困難であり、新たなアプローチが必要であった。そこで、分離能が優れたクロマトグラフィーを新たな形で併用することで、類似不純物のシグナル分離を実現できる新規定量 ¹H NMR の開発に取り組んだ。これは、クロマトグラフィーの支援によって定量 ¹H NMR における内標準法を拡張できる特長を持つことから、クロマトグラフィー支援拡張内標準法 (Extended Internal standard

a) 標準溶液 (st): 化合物X + 内標準物質 (IS) + 重溶媒



b) 試料溶液 (sp): 試料 + 内標準物質 (IS) + 重溶媒

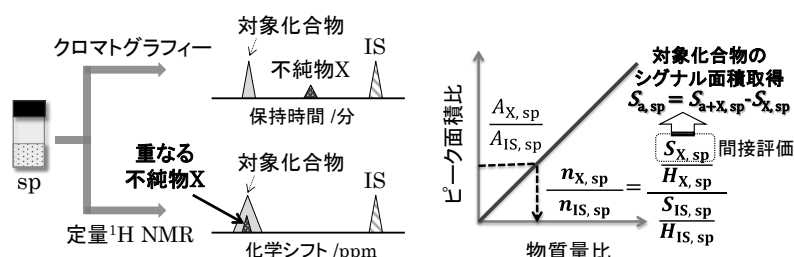


図3 EIC の操作手順

method of quantitative ^1H nmr assisted by Chromatography; EIC) と名付けた。図3に、EIC の操作手順を示す。試料に不純物として含まれる化合物 X が同定されているとき、化合物 X の試薬および内標準物質を含む標準溶液をクロマトグラフィーと定量 ^1H NMR でそれぞれ測定する(図 3a)。これにより、クロマトグラフィーで得た化合物 X および内標準物質のピーク面積比と定量 ^1H NMR で得た両者の物質質量比を関係付けた、相対モル感度を求める。次に、化合物 X が不純物として含まれる試料と、内標準物質を含む試料溶液をクロマトグラフィーで測定する (図 3b)。得られる化合物 X と内標準物質のピーク面積比および標準溶液で求めておいた相対モル感度から、試料溶液中の不純物 X と内標準物質の物質質量比を求めることができる。このとき、ここで得た物質質量比は両者の 1 分子あたりの ^1H 核の個数を考慮することで、 ^1H NMR スペクトルにおける不純物 X と内標準物質のシグナル面積比に換算できる。したがって、当該試料溶液の ^1H NMR スペクトルにおける内標準物質のシグナル面積を介して、対象化合物のシグナルに重なる不純物 X のシグナル面積を間接的に求めることができる。これを補正することで、対象化合物のシグナル面積を正しく求めることができる。

クロマトグラフィーには、水素炎イオン化検出・キャピラリーガスクロマトグラフィー (GC-FID) を用いた。GC-FID は、炭化水素化合物に対して高い感度を示し、かつ汎用性に優れたガスクロマトグラフィーである。GC-FID を用いた EIC をバリデーションした後、これによる 4-クロロフェノールの高純度標準物質のキャラクタリゼーションを検討した。その結果、類似不純物であるフェノールのシグナルの重なりを完全に除去し、4-クロロフェノールの純度を $0.9949 \text{ kg/kg} \pm 0.0022 \text{ kg/kg}$ (±の後の数字は、包含係数 $k=2$ の拡張不確かさ) と SI トレーサブルに決定できた。

EIC の有用性の検討を深めるために、GC-FID とは原理の異なるクロマトグラフィーとして、紫外吸光光度検出・キャピラリー液体クロマトグラフィー (LC-UV) を用いた EIC を検討した。その結果、LC-UV を用いた EIC によっても、4-クロロフェノールの純度を $0.9949 \text{ kg/kg} \pm 0.0022 \text{ kg/kg}$ (±の後の数字は、包含係数 $k=2$ の拡張不確かさ) と SI トレーサブルに決定でき、GC-FID を用いた EIC による純度と一致することがわかった。これは、FID および UV それぞれが広いリニアダイナミックレンジを持ち、物質質量比に正しく比例したピーク面積比を検出できるためと考えられる。したがって、EIC は、ガスクロマトグラフィーおよび液体クロマトグラフィーに依らず、適切な検出器を選びさえすれば、 0.22% の相対拡張不確かさ ($k=2$) で、SI トレーサブルなキャラクタリゼーションを実現できる汎用性の高い優れた手法であることを実証した。

第 5 章 結論

定量 ^1H NMR による新規なキャラクタリゼーション手法を系統的に研究した結果、親水性有機化合物である非タンパク質性アミノ酸類、アシルカルニチンおよびクロロフェノールの高純度標準物質に対して、目標とした 1% を概して満足できる相対拡張不確かさ ($k=2$) で、SI トレーサブルなキャラクタリゼーションを実現できた。本研究で確立したキャラクタリゼーション手法は、互いに補完し合うことで、幅広い種類の親水性有機化合物に適用できる。今後、本法の活用により、生体内代謝物など親水性有機化合物の新たな標準物質の整備が飛躍的に加速すると期待される。

学位論文審査報告書（甲）

1. 学位論文題目（外国語の場合は和訳を付けること。）

定量 ^1H NMR による高純度標準物質の新規なキャラクタリゼーション手法に関する研究

2. 論文提出者 (1) 所 属 物質化学 専攻

(2) 氏 名 齋 藤 直 樹

3. 審査結果の要旨（600～650 字）

本学位論文について、各審査委員による予備審査を行うとともに、平成 31 年 2 月 5 日に口頭発表会および論文審査委員会を開催し、以下のように判定した。

定量 ^1H NMR 法は、唯一つの内標準物質を用いて、多種類の有機化合物を高精度で正確に定量できる分析法であり、近年は高純度標準物質等の純度決定にも使用されるようになってきた。しかし、アミノ酸類などの親水性有機化合物の場合は、しばしば類似不純物や水の共存により標準物質として要求される高い精確さの定量が困難となる。本論文は、定量 ^1H NMR 法を各種親水性有機化合物の高純度標準物質の純度測定に拡充するために、溶液の液性と溶媒組成を調節することによるシグナル分離法の高度化、および NMR 測定とクロマトグラフィー測定を巧みに組み合わせた新規な定量法「クロマトグラフィー支援拡張内標準法（EIC）」を開発し、非タンパク質性アミノ酸類、アシルカルニチン類、クロロフェノール類等の高純度標準物質の精確な純度決定法を確立した。

以上より、本論文は定量 ^1H NMR 法の適用範囲を格段に広げる新規な定量手法を開発し、その有用性を実証するなど、分析化学分野における高い学術的および社会的貢献が認められることから、博士（工学）の学位に値するものと判断した。

4. 審査結果 (1) 判 定（いずれかに○印） ☒ 合 格 ・ ☐ 不合格

(2) 授与学位 博 士（工学）